

膵癌におけるマトリックス分解酵素の活性化機序とその阻害

著者	太田 哲生, 沼田 雅行, 大熊 勝治, 俵 友恵, 田島 秀浩, 伊藤 博, 月岡 雄治, 二上 文夫, 萱原 正都, 永川 宅和, 宮崎 逸夫
雑誌名	胆と膵 = The Biliary tract & pancreas
巻	16
号	5
ページ	407-412
発行年	1996-05-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/40318

膵癌転移の機序と制御—新しい知見—

膵癌におけるマトリックス分解酵素の
活性化機序とその阻害*

太田 哲生¹⁾・沼田 雅行²⁾・大熊 勝治³⁾・俵 友恵¹⁾
田島 秀浩・伊藤 博・月岡 雄治・二上 文夫
萱原 正都・永川 宅和・宮崎 逸夫

要約：近年、癌細胞の浸潤・転移に際し、癌細胞自身によって産生される細胞外マトリックス分解酵素の重要性が指摘されている。本稿では、ヒト膵癌が高率に trypsinogen, cathepsin B, matrix metalloproteases (MMPs) など種々のマトリックス分解酵素を発現すること、またこれら分解酵素が膵癌細胞で過剰発現がみられた第三の proton pump である vacuolar type ATPase (V-ATPase) によって autoactivation される可能性のあることを紹介した。これらの研究成績をもとに、筆者らは最近癌の浸潤・転移を制御する目的で protease inhibitor (PI) と proton pump inhibitor (PPI) を併用する新しい制癌療法 (PI・PPI 療法) を勧告し、さらなる基礎研究と臨床応用に着手している。

Key words：細胞外マトリックス分解酵素, Vacuolar type ATPase, 抗酵素療法, 抗プロトンポンプ療法

はじめに

近年、癌細胞の浸潤・転移に対する細胞外マトリックス分解酵素の関与が重要視されている。とくに、癌細胞自身によって産生されるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (urokinase-type plasminogen activator, u-PA) などのセリン系プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteases, MMPs) など他の細胞外マトリックス分解酵素の活性化に関与すると同時に、自らも基底膜や結合組織といった細胞外マトリックスを破壊する作用のあることが知られている^{1,2)}。しかし、癌細胞から分泌されるプロテアーゼは通常活性化されていない proenzyme として存在することが知られており、現在のところこれら proenzyme がどのような機序で活性

化されるかはわかっていないのが実状である。一方、癌細胞はこれら細胞外マトリックス分解酵素に対するインヒビター (例えば tissue inhibitor of metalloproteases, TIMPs や plasminogen activator inhibitor, PAI) も産生分泌し、細胞外マトリックス分解酵素活性の制御にかかわっていると考えられている^{3,4)}。

最近、筆者らはセリン系プロテアーゼの1つであり、通常膵の腺房細胞で産生・分泌されているトリプシノーゲンがヒト浸潤性膵管癌や他の消化器癌で高率に産生されることを報告し⁵⁻⁷⁾、u-PA と同様にトリプシノーゲンも活性体に変換されれば細胞外マトリックス分解酵素として癌の浸潤・転移に深く関与する可能性のあることを指摘してきた。

そこで、本稿では、筆者らのこれまでの研究から得られた成績をもとに、ヒト膵癌における細胞外マトリックス分解酵素の活性化機序とその制御について、私見を交えながら考察していく。

* Possible Mechanism of the Activation of Matrix-degrading Proteases in Human Pancreatic Cancer

1) 金沢大学第二外科 (〒920 金沢市宝町 13-1)

2) 同 第一解剖

3) 金沢大学薬学部

I. ヒト膵癌における細胞外マトリックス分解酵素の発現について

ヒト膵管癌を病理形態学的にみた場合、その多くは分化度の高い管状ないしは乳頭管状腺癌であり、程度の差こそあれ胞体内には粘液を有し、しかも線維増生 (desmoplastic change) を伴ってスキルスに増生するのが一般的である。しかも、ヒト膵癌は、その増殖能を argyrophilic nucleolar organizer region (Ag-NOR) counts でみるかぎりには、胃癌や大腸癌と比べ低値をとることが知られており⁸⁾、膵癌の悪性度は必ずしも高い増殖能で代表されるわけではないと考えられる。むしろ、種々の細胞外マトリックス分解酵素の過剰発現を伴いながら高い浸潤・転移能や強い運動能を示すことの方が膵癌の生物学的悪性度をよりよく表現していると思われる。そこで、筆者らが経験した浸潤性膵管癌 32 例における各種細胞外マトリックス分解酵素の蛋白レベルでの発現の頻度を免疫組織化学的手法を用いて検討したので、その成績を以下に示す。

対象は外科的に切除された 32 例の浸潤性膵管癌の原発巣である。光顕レベルの免疫染色には、ホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用い、脱パラフィン後に protease K 処理 (40 μ g/ml の濃度で 37°C, 5 分間) を行ない、その後は labeled streptavidin biotin 法 (SLAB 法) にて染色した。使用した一次抗体は抗ヒト pancreatic trypsinogen monoclonal antibody (Chemicon 社, USA), 抗ヒト cathepsin B polyclonal antibody (Binding Site 社, UK), 抗ヒト matrix metalloprotease 2 monoclonal antibody (富士薬品工業株式会社より供与) であり、いずれも specificity の確立したものを使用した。

発現の程度は、癌細胞の 5% 以上が染色されるものを発現陽性、5% 未満を発現陰性として取り扱った。その成績をみると、光顕レベルでは trypsinogen の発現は 30 例 (94%) であり、癌細胞の細胞質内に微細顆粒状として存在していた (図 1 b, c)。これらは原発巣のみならず、リンパ節や膵外神経叢の転移巣にも同様の所見が観察された (図 1 d, e)。また、cathepsin B の発現は 22 例 (69%)、MMP-2 の発現は 28 例 (88%) であり、これらはいずれも細胞質内にびまん性に観察された。臨床病理学的因子との関連では、trypsinogen, cathepsin B, MMP-2 はいずれも進行度と関係なく、浸潤性膵管癌では高頻度に過剰発現がみられた。しかも、これら細胞外マトリックス分解酵素は非浸潤性の膵管癌では発現がみられないか、みられ

ても非常に弱かったことより、これらの protease は癌細胞が間質への浸潤をしはじめる初期段階より過剰発現し、癌の浸潤・転移に深くかかわっているものと思われる。

II. ヒト膵癌におけるマトリックス分解酵素のインヒビター (protease inhibitor) の発現とその意義について

ヒト浸潤性膵管癌では、高率に trypsinogen, cathepsin B, MMP-2 が発現することが判明したが、次にそれぞれの inhibitor が癌巣部でどの程度発現がみられ、細胞外マトリックス分解酵素の制御にかかわっているかを光顕レベルの免疫染色法にて検討した。対象は同じく 32 例の浸潤性膵管癌であり、LSAB 法にて染色を行なった。発現の判定基準は protease のものと同じである。Trypsin(ogen) の inhibitor である pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) に対する一次抗体は抗ヒト PSTI monoclonal antibody (KN-1) (塩野義研究所より供与) を使用し、MMP-2 の inhibitor である TIMP-2 に対する一次抗体は抗ヒト TIMP-2 monoclonal antibody (富士薬品工業株式会社より供与) を使用した。その結果、PSTI は 31 例 (97%) に発現がみられ (図 1 f), TIMP-2 は 22 例 (69%) に発現がみられた。個々の症例において PSTI と trypsinogen の発現の量的バランスをみてみると、大部分の症例で PSTI と trypsinogen の発現がほぼ同程度であり、PSTI 発現の程度と臨床病理学的諸因子の間にはとくに関連はみられなかった。これに対し、TIMP-2 発現の程度と臨床病理学的諸因子との間には有意の相関はないものの、個々の症例での TIMP-2 陽性細胞数と MMP-2 陽性細胞数の量的バランスをみると、TIMP-2 が MMP-2 よりも多く発現がみられた TIMP-2 発現優位群の方が MMP-2 発現優位群よりも有意に手術時には肝転移が少なく、術後の生存期間も長いという結果が得られた。

このように、浸潤性膵管癌において MMP-2 と TIMP-2 酵素の量的な不均衡が癌の血行性転移ときわめて密接な関係があることが示唆された。しかし、trypsinogen と PSTI については個々の症例でみるかぎり同程度に発現しており、両酵素の量的な不均衡は顕著でなかった。すなわち、膵癌細胞で trypsinogen を過剰発現している症例では PSTI も過剰発現していることになり、過剰発現している PSTI により trypsin(ogen) 活性が強く制御されているとも考えられる。しかし、一般に PSTI は trypsin と会合して複

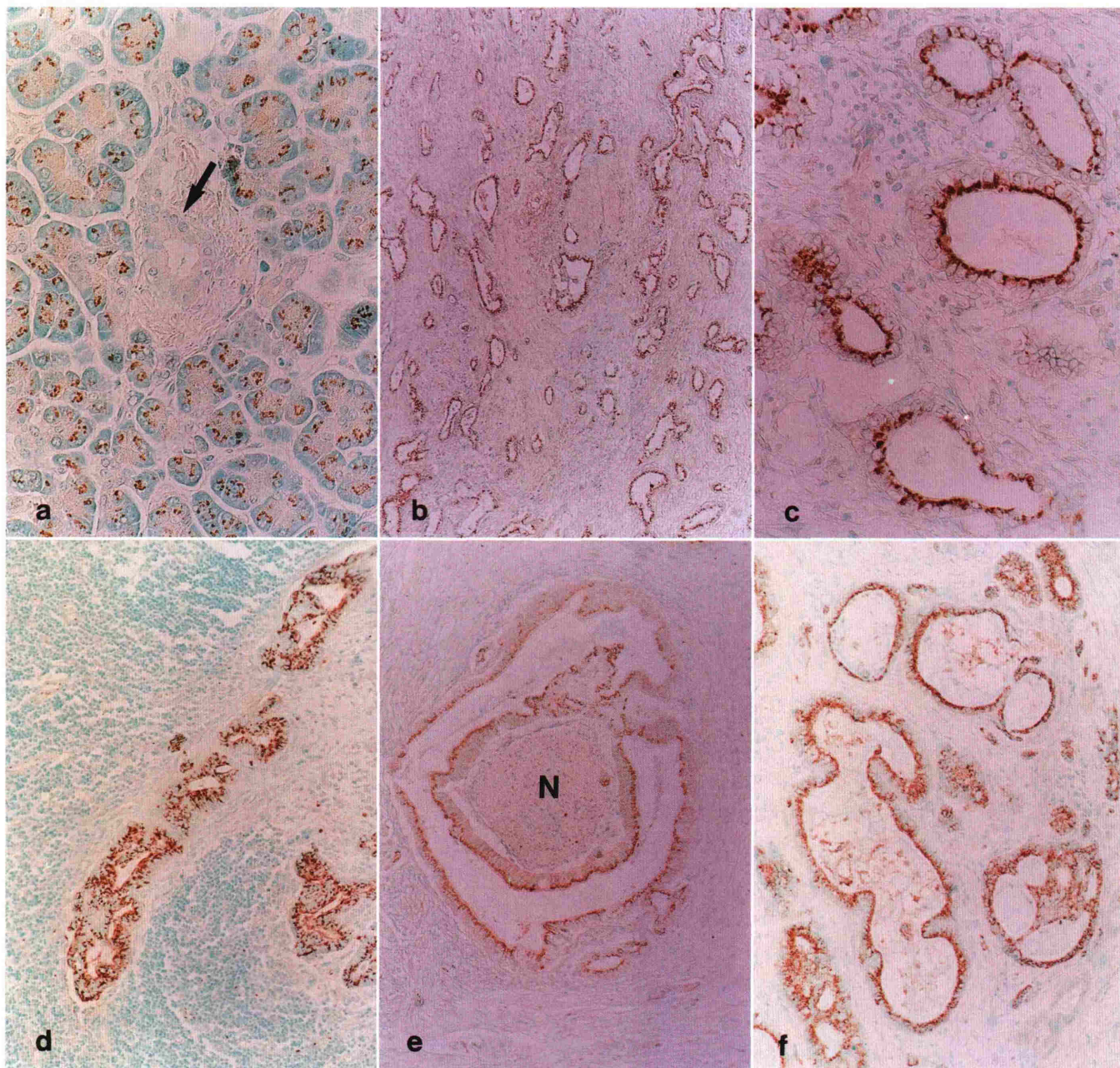


図 1 ヒト正常膵ならびに膵癌組織における trypsinogen と pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) の免疫組織化学的染色

正常膵では、腺房細胞は強く trypsinogen に染色されるが、膵管（矢印）やラ島は染色されない（a： $\times 200$ ）。一方、多くの膵癌細胞は原発巣でびまん性に trypsinogen に強く染色される（b： $\times 40$, c： $\times 200$ ）。また、リンパ節や膵外神経叢の転移巣でも同様に強く染色される（d： $\times 140$, e： $\times 120$, N：神経）。このほか、膵癌細胞は trypsinogen と同程度の PSTI を産生している（f： $\times 160$ ）。

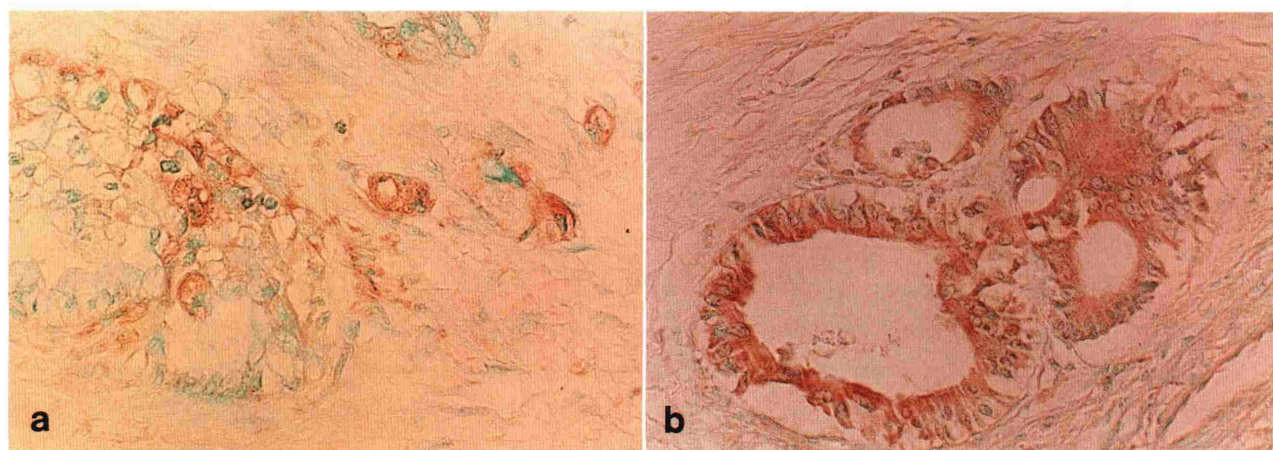


図 2 ヒト膵癌組織における V-ATPase 免疫組織化学的染色（a, b： $\times 200$ ）

膵癌細胞では、V-ATPase の 16-kDa subunit に対する免疫反応物質が細胞質にびまん性にみられる。

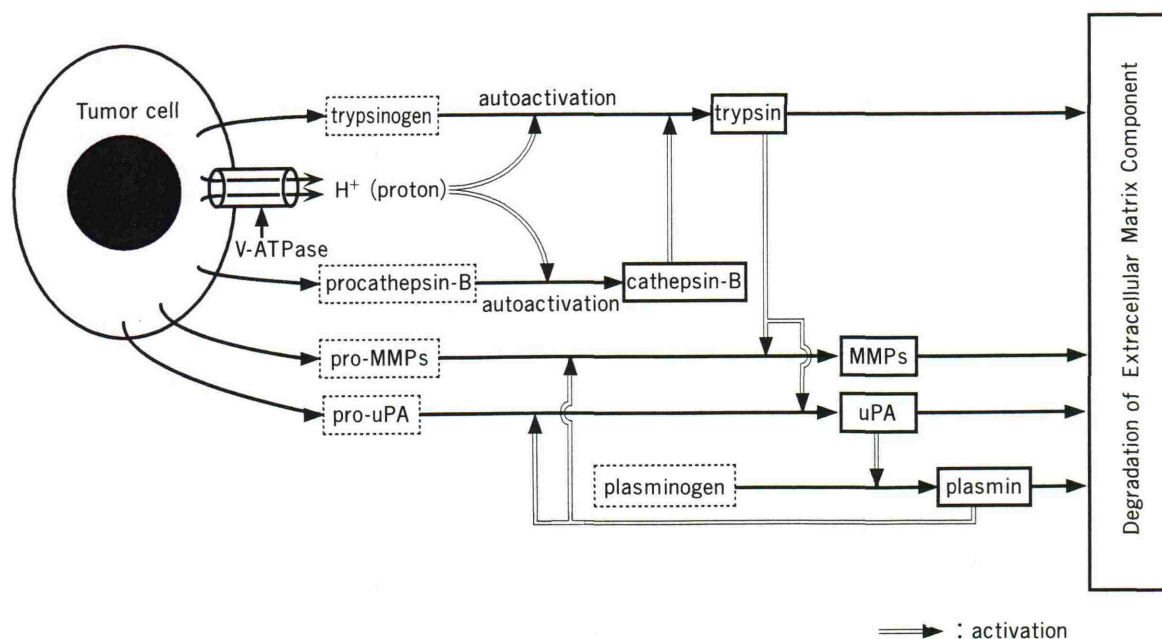


図 3 腫瘍組織における細胞外マトリックス分解酵素活性化の機序 (仮説)

合体を形成し、いったんは trypsin 活性を阻害するが、時間の経過とともに trypsin 活性が復活してくる (PSTI の一時的阻害) ことが知られており、Kunitz 型インヒビターである塩基性トリプシン・インヒビター (BPTI) が trypsin と安定な複合体を形成し永久阻害するのとは対照的であるともいわれている⁹⁾。また、一般に癌巣部は酸性環境下にあり^{10,11)}、このような部位では trypsin と PSTI の複合体は解離しやすいことも知られている。したがって、ヒト腫瘍組織中に過剰発現している PSTI は必ずしも永続的に抗 trypsin 作用を発揮するとは限らないと思われる。むしろ、PSTI は上皮成長因子 (EGF) と相溶性が高いことやヒト線維芽細胞の DNA 合成を促進させることがわかっており^{12,13)}、ヒト腫瘍組織での desmoplastic change の機序を考えるうえで非常に興味のある酵素である。

III. 細胞外マトリックス分解酵素の活性化の機序について

腫瘍細胞は、trypsinogen, cathepsin B, MMP-2 以外にも u-PA や MMP-1, MMP-9 などの protease を分泌していることが知られている。しかし、これら protease はいずれも proenzyme の不活型で分泌されており、いまだ生体内の癌巣部での活性化の機序が明らかにされていないのが実状である。最近、筆者らはこれら細胞外マトリックス分解酵素のうちでも trypsinogen や cathepsin B の protease が

autoactivation により活性型に変換される可能性をつきとめたので、その成績を紹介する。

Vacuolar type H^+ -ATPase (V-ATPase) は F_1F_0 -ATPase (ミトコンドリアに存在し、ATP 合成に関与)、 H^+ - K^+ -ATPase (P-ATPase とも呼ばれ、主に胃の壁細胞の頂端膜に存在し、細胞外に H^+ を排出) に次ぐ第 3 の proton pump として近年見出されたもので、真核生物の液胞, lysosome, endosome, the trans-Golgi network (TGN), clathrin-coated secretory vesicle などの細胞内膜系に広く分布しており、各オルガネラの微小環境を酸性に保つことにより、おのおの独自の機能を発揮させていると考えられている¹⁴⁻¹⁶⁾。最近、筆者らは癌細胞が第 3 の proton pump である V-ATPase を強く発現しているのを 16-kDa subunit の mRNA レベルで確認し (RT-PCR 法を用いて分析)、さらに 16-kDa subunit に対する抗血清を用いてこの pump が癌細胞質内に強く発現しているのを免疫染色を行ない蛋白レベルでその発現を確認した (図 2)¹⁷⁾。この V-ATPase がヒト癌組織中で強く発現しているのを指摘したのは、内外でわれわれが初めてである。ヒトの V-ATPase は約 9 種類のポリペプチド (subunit) から成り立っており、胃の壁細胞に存在する H^+ - K^+ -ATPase とは構造的にも明らかに異なるものであり、bafilomycin A_1 で特異的に抑制されることが知られている¹⁸⁾。この V-ATPase は癌細胞のみならず、破骨細胞、マクロファージ、活性化好中球の細胞膜にも発現しており、最近この細胞膜にある V-ATPase は protein kinase C (PKC) により up

-regulation することも知られている¹⁹⁻²¹⁾。したがって、癌の細胞外は酸性環境下であるにもかかわらず癌細胞質内の pH が低下しないで alkaline side で保持されている機序として、従来より Na⁺/H⁺ exchanger の関与が指摘されていたが²²⁾、V-ATPase も pH 調節の一翼を担っているものと思われる。この際、細胞外へ排出された H⁺ は、癌細胞が浸潤、転移する際に癌細胞自身から分泌している種々の細胞外マトリックス分解酵素のうち、procathepsin B や trypsinogen などの proenzyme を活性型に変換 (autoproteolytic activation) する可能性が十分考えられる。なぜならば、procathepsin B や trypsinogen は acidic pH (pH 4.5-5) で効率よく autoactivation されることが *in vitro* の実験で確認されているからである^{23,24)}。

以上、これらの研究成果をもとに、癌組織における細胞外マトリックス分解酵素の活性化機序の仮説を図 3 に示した。

IV. 細胞外マトリックス分解酵素の制御について

前述のごとく、ヒト膀胱癌組織中には trypsinogen と同程度にそのインヒビターである PSTI が過剰発現している。しかし、この PSTI が酸性環境下にある癌巣部に効果的に抗 trypsin 作用を発揮するとは限らないことから、trypsin や plasmin などの serine protease 活性を広範囲に永久阻害する目的で低分子の合成多価 serine protease inhibitor を十分量外因性に投与することの意義はあると考えている。最近、筆者らは浸潤・転移に係わっている細胞外マトリックス分解酵素の制御を目的に FOY-007 (FOY®) と FOY-305 (Foipan®) の併用による protease inhibitor 療法 (PI 療法) を試みており、著効例も経験している²⁵⁾。

ところで、筆者らは V-ATPase が癌細胞内 pH の調節だけでなく、癌細胞が浸潤、転移する際に必要なマトリックス分解酵素の活性化にも深く関与している可能性のあることを指摘したが¹⁷⁾、このほか V-ATPase は増殖因子とその受容体が癌細胞内へ internalization され、その後に酸性顆粒内 (endosome や lysosome) へと transports される時にも関与していると考えられている²⁶⁾。さらには、最近 V-ATPase の component である 16-kDa subunit が bovine papilloma virus (type 1) の E5 protein と結合して増殖因子受容体を ligand の存在なしで活性化することもわかってきている²⁷⁾。つまり、V-ATPase は proton の移動を通して癌細胞が円滑に増殖・浸潤していくの

に至適な環境作りをしていると考えられる。したがって、この V-ATPase の作用を抑えることにより癌細胞の至適環境を変えて癌細胞の増殖ならびに浸潤を抑制することが可能となるわけである。

現在のところ、V-ATPase 特異的に抑制する薬剤としては、前述したように bafilomycin A₁ があるが、これは nM レベルで作用を発揮するが、かなり毒性の強い薬剤で、このままでは臨床の場では使えない可能性がある。そこで、筆者らが注目したのが lansoprazole や omeprazole である。これらは、胃の壁細胞に存在する p-type の proton pump (H⁺-K⁺-ATPase) を特異的に抑制するということで開発された薬剤である。しかし、幸いなことに omeprazole は V-ATPase の 72-kDa subunit に結合し、V-ATPase の作用を抑制することが知られている^{28,29)}。しかもこれらの薬剤は酸性環境下ではじめて活性体に構造変換され、pump と永久結合してその場に停滞するというユニークな薬理作用をもっている³⁰⁾。癌組織では、すでに述べたように乳酸などの代謝産物の蓄積だけでなく、V-ATPase によって排出された H⁺ も加わって酸性環境下にあるので、胃の壁細胞領域でみられたと同様の機序で癌細胞の細胞外マトリックスにも proton pump inhibitor が集積して V-ATPase の機能を抑制する可能性が示唆されるのである。そこで、筆者らは、これらの研究成果をもとに protease inhibitor (PI) と proton pump inhibitor (PPI) を併用する新しい制癌療法 (PI・PPI 療法) を勘案し、さらなる基礎研究とともに臨床応用に着手している。

参考文献

- 1) Duffy MJ, Reilly D, Sullivan CO, et al. : Urokinase plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* **50** : 6827-6829, 1990.
- 2) Kogha S : Localization of plasminogen activators in human colon cancers by immunoperoxidase staining. *Cancer Res* **45** : 1787-1796, 1991.
- 3) 佐藤 博, 清水元治 : マトリックスメタロプロテアーゼおよびインヒビターの発現調節機構と癌転移. *実験医学* **10** : 263-270, 1992.
- 4) Baker MS, Bleakley P, Woodrow GC, et al. : Inhibition of cancer cell urokinase plasminogen activator by its specific inhibitor PAI-2 and subsequent effects on extracellular matrix degradation. *Cancer Res* **50** : 4676-4684, 1990.
- 5) Ohta T, Terada T, Nagakawa T, et al. : Pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human pancreatic

- carcinomas and associated lesions. *Br J Cancer* **69** : 152-156, 1994.
- 6) Ohta T, Terada T, Nagakawa T, et al. : Differential expression of pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human scirrhou-type and intestinal-type gastric carcinomas. *Oncology Reports* **1** : 203-208, 1994.
 - 7) Ohta T, Terada T, Nagakawa T, et al. : Expression of pancreatic trypsinogen in human extrapancreatic gastrointestinal carcinomas. *Oncology Reports* **1** : 759-764, 1994.
 - 8) 内田英二, 恩田昌彦, 相本隆幸, ほか : 細胞増殖関連諸因子と膵癌の悪性度. *胆と膵* **14** : 529-534, 1993.
 - 9) 寺岡 宏, 吉田信男 : ヒト膵分泌性トリプシンインヒビター (PSTI) のタンパク質工学. *タンパク質 核酸酵素* **35** : 2654-2664, 1990.
 - 10) Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P : Blood flow, oxygen and nutrient supply, the metabolic microenvironment of human tumors. *Cancer Res* **49** : 6449-6465, 1989.
 - 11) Stubbs M, Bhujwalla ZM, Tozer GM, et al. : An assessment of ^{31}P MRS as a method of measuring pH in rat tumors. *NMR Biomed* **5** : 351-359, 1992.
 - 12) Yamamoto T, Nakamura Y, Nishide T, et al. : Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **132** : 605-612, 1985.
 - 13) Ogawa M, Tsushima T, Ohba Y, et al. : Stimulation of DNA synthesis in human fibroblasts by human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **50** : 155-158, 1985.
 - 14) Forgac M : Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* **69** : 765-796, 1989.
 - 15) Nelson N : Structure, molecular genetics and evolution of vacuolar H^+ -ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **21** : 553-571, 1989.
 - 16) Moriyama Y, Futai M : H^+ -ATPase, a primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* **173** : 443-448, 1990.
 - 17) Ohta T, Numata M, Ohkuma S, et al. : Expression of vacuolar-type H^+ -ATPases in human pancreatic cancer. (submitted).
 - 18) Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K, et al. : Bafilomycins : a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** : 7972-7976, 1988.
 - 19) Vaananen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, et al. : Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar type H^+ -ATPase in the ruffled borders of osteoclasts. *J Biol Chem* **265** : 7645-7654, 1990.
 - 20) Bidani A, Brown SES : ATP-dependent pH recovery in lung macrophages : evidence for a plasma membrane H^+ -ATPase. *Am J Physiol* **28** : C586-C598, 1992.
 - 21) Nanda A, Gukovskaya A, Tseng J, et al. : Activation of vacuolar-type proton pumps by protein kinase C. *J Biol Chem* **267** : 22740-22746, 1992.
 - 22) Boyer MJ, Tannock IF : Regulation of intracellular pH in tumor cell lines : influence of microenvironmental conditions. *Cancer Res* **52** : 4441-4447, 1992.
 - 23) Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett AJ : Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **369** : 293-298, 1988.
 - 24) Mach L, Mort JS, Glossl J : Maturation of human procathepsin B. *J Biol Chem* **269** : 13030-13035, 1994.
 - 25) 太田哲生, 永川宅和, 根塚秀昭, ほか : 抗酵素療法が奏功した膵トリプシノーゲン産生十二指腸癌 (びまん浸潤型低分化型腺癌, scirrhou-type) の 1 例. *現代医療* **26** : 2989-2997, 1994.
 - 26) Forgac M : Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* **69** : 765-796, 1989.
 - 27) Goldstein DJ, Andresson T, Sparkowski JJ, et al. : The BPV-1 E5 protein, the 16 kDa membrane poreforming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *EMBO J* **11** : 4851-4859, 1992.
 - 28) 森山芳則 : 動物細胞における液胞型 H^+ 輸送性 ATPase (V-ATPase) の発見とその構造と機能に関する研究. *生化学* **65** : 413-436, 1993.
 - 29) Chatterjee D, Chakraborty M, Leit M, et al. : Sensitivity to vanadate and isoforms of subunits A and B distinguish the osteoclast proton pump from other vacuolar H^+ -ATPases. *Proc Natl Acad Sci USA* **89** : 6257-6261, 1992.
 - 30) 佐藤 宏, 長屋秀明 : プロトンポンプインヒビター (PPI) の酸分泌抑制作用機序—オメガプラゾールとランソプラゾールを中心に—. *医学のあゆみ* **159** : 767-770, 1991.

* * *